

ハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) および
サキシマハブ (*T. elegans*) 毒の
腫脹活性の定量的研究

山川雅延¹⁾ 野崎真敏¹⁾ 外間善次¹⁾

Studies on the Quantitative Method for Determination of Edema
Forming Activity of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) and
Sakishima Habu (*Trimeresurus elegans*) Venoms

Masanobu YAMAKAWA, Masatoshi NOZAKI and Zenji HOKAMA

A quantitative method for determination of edema forming activity of Habu and Sakishima Habu venoms were attempted by inoculation on the sole of mouse. The venom samples used was crude Habu (*T. flavoviridis*) venom, crude Sakishima Habu (*T. elegans*) venom and four kinds of partially purified venoms by gel filtration.

10 μ l of the venom was injected into right sole of 15-18 g weight of mouse. Then both legs were cut off at 8 hours after injection and weighted.

The edema ratio, against healthy left sole was calculated as follows;

$$\text{Edema ratio (Y \%)} = \frac{\text{mg of right (edema) leg}}{\text{mg of left (healthy) leg}} \times 100$$

The swelling caused by the snake venom developed quite quickly and reached the maximum about one hour after inoculation. The edema which caused by HII recovered more rapidly than crude venom and other purified venoms. By the statistical analysis of the results obtained, it was elucidated that there is linearity and parallelism between log doses of each venoms (x) and edema ratio.

Common slope \bar{b} was 31.2, common variance S^2 was 61.7 at the 8 hours observation. The "Minimum Edema Dose (MED)" was defined as "the least quantity of venom which cause 120 % of edema ratio by inoculation into the sole of mouse"

Thus, 1 MED of the crude venoms at 8 hours after the injection could be calculated by following equation $x = x - (Y - 120) / \bar{b}$ as;

crude Habu venom:	0.51 (0.42—0.63) μ g
crude Sakishima Habu venom:	0.69 (0.59—0.86) μ g

The relative potency between two kinds of venom and its fiducial limits at 5 % level of risk were calculated as;

$$\begin{aligned} & \text{Habu crude venom/Sakishima Habu crude venom} \\ & = 1/0.71 (0.54—0.92) \text{ at 8 hours observation.} \end{aligned}$$

Likewise, the results of the edema-forming activity of fractionated venoms could be analyzed statistically by the parallel line assay method.

It was found that HI (HR I) fraction has much edema forming activity as well as hemorrhagic activity and lethal toxicity, but HII (HR II) fraction had no swelling effect at 18

hours, in spite of recognizable at 8 hours.

Two kinds of edema forming fraction were obtained Sakishima Habu venom; one (SII) was accompanied with intensive hemorrhagic activity as well as lethal toxicity and the other (SIII) has higher lethal toxicity than that of SII without hemorrhagic effect.

まえがき

わが国の南西諸島におけるハブおよびサキシマハブの被害は毎年約 800 件に昇り、同地域住民にとつて農林業開発上重要な問題になつてゐる。

これらの毒蛇咬症の治療対策は近年大きな進歩を見るに至つたが、受傷に際しておこる腫脹については出血、壊死と並んで重要な局所症状の一つであるにも拘らずあまり研究されていない。

これまでの腫脹に関する研究では沢井等¹⁾(1967)がマウスの足蹠法を用いてハブ毒に腫脹活性のあることを示し、ジヒドロオクト酸不活化ハブ毒素キソイドの毒性試験の一環に導入しようと試みた。また小此本等²⁾(1968)はアルコール・ホルマリントキソイドの腫脹活性が著しく減弱していることを示した。

また外間³⁾(1972)および林⁴⁾(1972)はそれぞれサキシマハブ毒あるいはタイワンハブ毒の腫脹活性にふれている。

ところでさきに山川⁵⁾(1972)はサキシマハブ毒の出血および致死因子について研究し、ゲル透過によつて得られた画分について出血および致死効果について検討を行つた。その際サキシマハブ毒中には 3 種の異つた致死作用を示す画分が存在すること、および出血作用を殆ど示さない腫脹作用のみを示す画分のあることを報告した。

そこで本研究では腫脹活性の定量法を検討し、さらにハブおよびサキシマハブ毒の腫脹作用について研究を進めた結果、2, 3 の新知見を得たのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 蛇毒：ハブ毒は 1971 年、サキシマハブ毒は 1965 年当研究所で採毒し、凍結乾燥保存したものをを用いた。

2. 粗毒のゲル透過：出血あるいは腫脹の精製画分を得るために前回⁶⁾同様 Sephadex G100 を用いて M/200 Tris バッファー (pH 8.5) によつて各画分の部分精製を行つた。すなわちハブ粗毒 (HC) のゲル透過によつて得た 2 種の画分を HI および HII とした。この両画分は大森等⁷⁾によつて報告された HRI および HR II に相当する画分でウサギ皮内注射によつて出血作用を示す。

同様にサキシマハブ粗毒 (SC) をゲル透過して 3 種の致死作用画分を得た。この内出血作用の強い SII 画分と出血作用の非常に弱い SIII 画分を本実験に用いた (図 4, 図 5)。

3. マウス足蹠注射による腫脹率測定法：服部、小此本による方法を用い各毒の稀釈液をマウス (15~18 g, DDK) の右後肢足蹠の皮下に注射した。注射量は 10 μ l でマイクロシリンジ (50 μ l) の先端を足蹠注射用に改良したもの (仁丹 KK 製) を用いた。毒の稀釈には M/30 PBS (ゼラチン添加, pH 7.0) を用いた。左足蹠は無処置対照とした。

判定は注射後 8 時間に、注射した後肢の距骨関節を約 90° に曲げ、45° の角度にハサミを入れて切断する。同様に切断した左健足側の重量を 100% とし、これと比較して腫脹側の重量をパーセントで計算した。さらにこれらの毒は同時にマウス静注法による LD₅₀ (Reed & Muench 法)⁸⁾ およびウサギの皮内法により出血活性 (MHD) を定量した。

実験成績

1. 正常マウスの足蹠重量および注射量の検討

正常マウス 20 匹の左右足蹠の重量を t 検定法によつて比較した結果、両者の間に有意な差は認められなかつた。すなわち危険率 1% で信頼限界を求めると、左足蹠の重量を 100% とすると右足蹠は 94~108% であつた。

次に注射量を 10 μ l から 50 μ l まで増量し、またハブ粗毒を 1 μ g から 30 μ g まで変量してその腫脹率を測定した。その結果を 2 元配置にして分析した結果、注射量が増すに従つて誤差分散も大きくなる傾向を示した。とくに 40 μ l 又は 50 μ l の注射量はマウス足蹠には過剰で試料の一部が漏出することがあつた。そこで本実験では注射量を 10 μ l としたが 30 μ l 以下では誤差分散の間には有意な差は認められなかつた。また従来使用されている 0.5~1 ml の注射筒は注射量が不正確で本実験には不適であつた。

2. 粗毒および分画毒の腫脹作用

ハブ粗毒 (HC: 3 μ g) およびサキシマハブ粗毒 (SC: 3 μ g) と各分画毒, HI (4 μ g), HII (28 μ g), SII (3 μ g), および SIII (36 μ g) について経時的に腫脹活性をしらべた結果は図 1 にまとめられた。図 1 に示されたよ

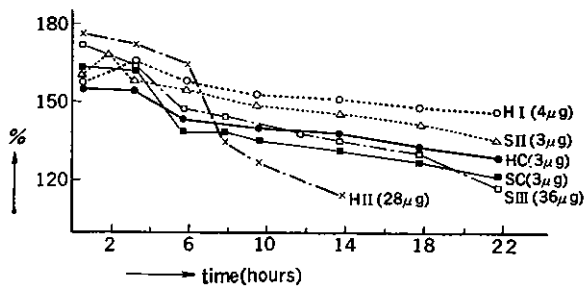


Fig. 1. Time course curves of edema of sole of mouse induced by HC, HI, HII, SC, SII & SIII.

HC: Crude habu (*T. flavoviridis*) venom, HI: Separated from HC by gel filtration, HII: Separated from HC by gel filtration, SC: Crude Sakishima-habu (*T. elegans*) venom, SII: Separated from SC by gel filtration, SIII: Separated from SC by gel filtration.

うに腫脹は注射後1ないし2時間が最も高い値を示し、その後は6時間後まで徐々に減退し、その後はさらにゆるやかな減退を示した。しかし HII では、注射後2ないし6時間では著明な腫脹を示すが、その後は急激に減退した。又同一の毒であつても毒量が多い程腫脹の持続時間が長く、少ない程回復が早いことが観察されたが、ほぼ6時間以後はゆるやかな減退を示した。従つてこれらの差異を考慮して、爾後は注射後8時間に判定を行うこととした。

3. 毒量と腫脹率との関係

次にハブ粗毒およびサキシマハブ粗毒のそれぞれ 0.1 μg, 0.3 μg, 1 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 100 μg, 300 μg について腫脹率を検討すると図2のような結果を得た。この両者のカーブを比較すると、いずれも腫脹率が 120

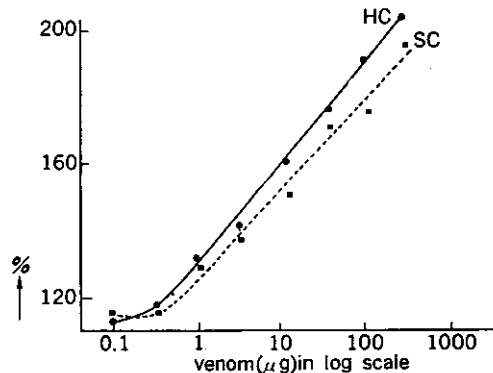


Fig. 2. Dosage response curves (at 8 hours). HC: Crude habu venom, SC: Crude Sakishima habu venom.

Table 1. Analysis of variance (at 8 hours)

Nature of variation	SS	df	MS
Preparation	4128	5	824.6
Regression	61809	1	61809
Parallelism	266	5	53.2
Linearity	323	10	32.3
Between doses	66526	21	3167.9
Error (within doses)	12213	198	61.7
Total	78739	219	

SS: Sum of squares, df: degrees of freedom, MS: Mean squares.

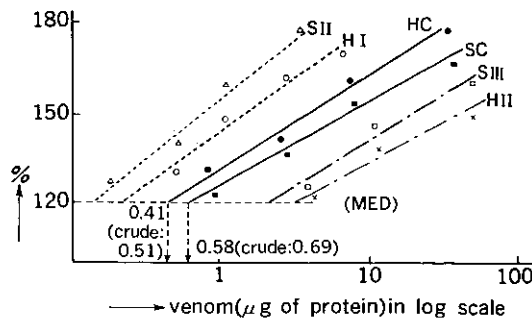


Fig. 3. Dosage response line (at 8 hours)

HC: Crude habu venom, HI: Separated from HC by gel filtration, HII: Separated from HC by gel filtration, SC: Crude Sakishima-habu venom, SII: Separated from SC by gel filtration, SIII: Separated from SC by gel filtration, MED: Minimum edema dose. Common slope \bar{b} is 31.2, common variance s^2 is 61.7.

%以上の範囲では毒量(対数目盛)との間にほぼ直線的な関係になり立つ事がわかる。

次に上と同様な実験を HI, HII, SII, SIII についても行つた。これらの結果をまとめて表1の成績を得た。すなわち毒量の対数值(x)と腫脹率(Y)間には直線関係が成立し、かつ粗毒と精製毒の間には平行関係を認めた。この場合の誤差項の不偏分散(MS): common variance $S^2=61.7$ であつた。又直線の平均スロープ \bar{b} は $\Sigma S_{xy}/\Sigma S_{xx}$ (S : 偏差平方和)により算出すると $\bar{b}=32.1$ であつた。この関係は図3にまとめられた。ここで、「腫脹率120%を起すに必要な毒の最少量を1最少腫脹量(Minimum Edema Dose, MED)」と定義すると、各毒の 1MED は図3から読取るか又は次式によ

つて計算することができる。

$x = \bar{x} - (\bar{Y} - 120) / \sqrt{b}$ 但し x は毒量対数値、 \bar{x} は x の平均値および \bar{Y} は全ての測定点における腫脹率 Y の平均値である。

すなわち、HC および SC の 1MED を上記の方法で求めるとそれぞれ 0.51 μg および 0.69 μg で、蛋白量に換算すると各々 0.41 μg および 0.58 μg であつた。またこの両者の相対力価およびその信頼限界は 1 : 0.71 (0.54~0.92) であつた。各画分の相対力価およびその信頼限界 (危険率 5%) は表 2 に示されたとおりである。

Table 2. Relative potency and fiducial limits (at 5% of risk)

HC	1
HI	2.8 (2.18—3.67)
III	0.2 (0.08—0.42)
SC	0.71 (0.54—0.92)
SC	1
SII	4.56 (3.55—5.86)
SIII	0.19 (0.08—0.44) at 8 hours.

See the foot note of Fig. 3.

4. ハブおよびサキシマハブ毒のゲル濾過による腫脹画分と致死および出血活性との関係

これまでの実験で明らかにされた腫脹活性の定量法を応用してハブおよびサキシマハブ毒中の腫脹活性画分をしらべ、更に致死および出血活性との関係を検討した。

Sephadex G100 を用いてハブ粗毒およびサキシマハ

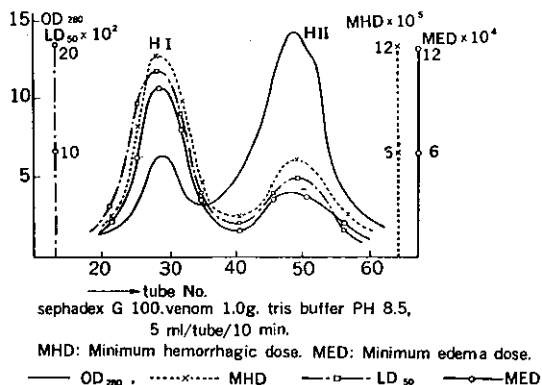


Fig. 4. Fractionation of crude Habu venom and its toxicities.

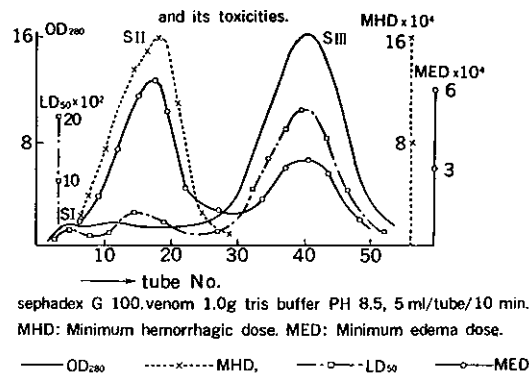


Fig. 5. Fractionation of crude Sakishima habu venom and its toxicities.

ブ粗毒を分画し、各試験管について OD₂₈₀, LD₅₀, MHD (最小出血量) および MED を測定した結果は図 4 および図 5 に示された。図 4 では HI 画分には致死、出血、腫脹の各活性が強く認められたが、蛋白量は少なかった。これに反し HII 画分は蛋白量も多く、致死、出血、腫脹活性はいずれも弱かった。又、HI 画分はマウス足蹠注射によつて強い出血を伴う腫脹を示すのに対して HII 画分は弱い出血を伴う腫脹であつた。

次に図 5 に示されたようにサキシマハブ毒の致死活性ピークは SI, SII, SIII の 3 つが認められたが、SIII に最も強い活性が認められた。出血活性の大半は SII と一致し SIII は非常に弱かった。また、腫脹活性は SII および SIII に含まれていたが、前者は強い出血を伴つたが、後者は出血を殆ど認めなかつた (写真 1)。

考 察

ハブおよびサキシマハブ毒は受傷局所に激しい出血および腫脹を起し後日壊死による後遺症を残すことも少くない。従つて出血あるいは腫脹と壊死との関係を究明することは治療対策上大きな意義を有する。われわれはこの問題に関連してまず、蛇毒の腫脹活性を定量化することを目的とした。

ハブあるいはサキシマハブ毒の腫脹活性をマウス足蹠法で定量するにはまず実験に使用するマウス足蹠の重量、注射量の検討が必要であるが上記の実験結果から一定重量のマウスを用い、接種毒量を 10 ないし 30 μl の範囲内で行えばよいことが明らかにされた。

次に腫脹の判定時間は、これまでの報告では注射後 24 時間で測定が行われていたが本実験が示したように、とくに HII 画分が注射後数時間で急激に腫脹が回復してしまうような場合を考えると、腫脹の測定には時間的配

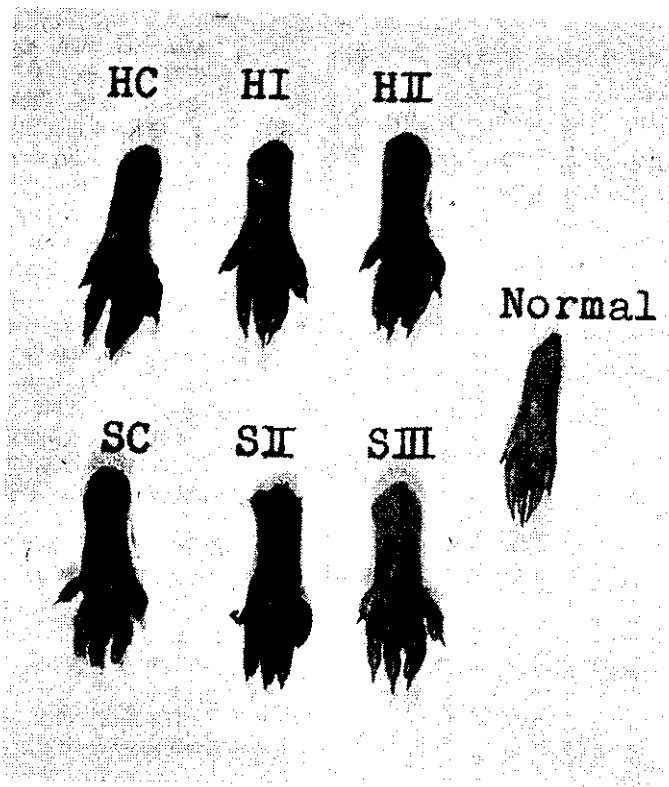


Photo 1. Edema of mouse leg with and without hemorrhage, HC: Crude habu venom; HI: Separated from HC by gelfiltration; HII: Separated from HC by gel filtration; SC: Crude venom of Sakishimahabu; SII: Separated from SC by gel filtration; SIII: Separated from SC by gel filtration.

慮が十分に加えられなければならないと考える。すなわち、判定時間が異なると各画分の腫脹量に著しい差が生じるので経時的観察を行つて時間的要因を加味しなければならないことが今後の課題として残される。

ハブ、サキシマハブ毒およびその分画毒の各毒量の対数と腫脹率間には直線性と平行性が認められるが、この事は今後、抗毒素の抗腫脹力価あるいはトキシノイドの抗原性の検討に役立つであろう。

さて、ハブ毒とサキシマハブ毒の腫脹活性を比較すると、ハブ毒では腫脹の主なピークは HI にあり強い出血、致死作用を伴っているが、サキシマハブ毒では主として SII にあり同様に強い出血を伴っているが致死活性は低い。これに反して SIII は出血活性が非常に弱いが腫脹活性と致死活性がかなり見られるのが特徴的である。この様にハブ毒とサキシマハブ毒は種々の点で異なっていること、又出血と腫脹は必ずしも平行して起らない

ことなどが観察された。

なお、SI の性質については更に精製を進めた上で検討したい。

総 括

マウス足蹠法によつてハブ毒、サキシマハブ毒およびその分画毒の腫脹活性を定量することを試みた。

1. マウス足蹠に対する注射量は $10\sim 30\ \mu\text{l}$ が適当である。
2. 腫脹は注射後 $1\sim 2$ 時間で最高に達する。
3. 注射後 8 時間で判定すると毒量の対数と腫脹率 120% 以上の範囲では直線関係が成立し、かつ粗毒と精製毒間には平行関係を認める。この場合の common variance $S^2=61.7$, common slope $\bar{b}=32.1$ であつた。
4. 「腫脹率 120% を起すに必要な毒の最小量 (MED)」を 1 最小腫脹量と定義するとハブおよびサキシマハブ粗

毒の 1MED はそれぞれ 0.51 μ g, 0.69 μ g でその相対力価は 1 : 0.71 (0.54~0.92) であった。

5. ハブ毒のゲル透過による分画では HI, HII の 2 種の腫脹活性画分を認めた。HI は強い出血を伴う腫脹であり HII は弱い出血を伴って急激に腫脹が回復した。

6. サキシマハブ毒のゲル透過による分画では SII, SIII の両画分に強い腫脹活性を認めた。SII は強い出血を伴う腫脹であるのに対し SIII は非常に弱い出血を伴ったが強い致死作用を有していた。

なお、本稿の要旨は第14回日本熱帯医学会総会で演述された。

参考文献

- 1) 服部善八郎：腸炎ピブリオの実験的感染法に関する研究。(第Ⅲ, 第Ⅳ報). 東京獣医学畜産学雑誌, 13, 1970.
- 2) 外間善次：サキシマハブ (*Trimeresurus elegans*) 毒トキシノイドに関する基礎的研究. Snake, 4, 23-33, 1972.
- 3) Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R. & Ohsaka, A.: Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of HABU snake venom. Japan. J. Med. Sci. Biol. 13, 43-51, 1960.
- 4) 近藤 了, 他：ハブ毒の LD₅₀ の測定に関する 2~3 の問題. 実験動物, 9(2), 1960.
- 5) L. J. Reed and H. Muench: A simple method of estimating 50 per cent end-points. Amer. J. Hyg., 27, 493-497, 1938.
- 6) N. Bhargava, et al.: Dissociation of oedema provoking factor of *Agkistrodon Piscivorus* venom from kininogenase.
- 7) Omori-Satoh, T. et al.: A simple and rapid method for separating two hemorrhagic principles in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Toxicon, 5, 17-24, 1967.
- 8) 小此木 丘, 服部善八郎：ハブ蛇毒のアルコール処理による弱毒化とその免疫原性について. 日本細菌学雑誌, 23(2), 1968.
- 9) 佐藤一英, 他：脈管透過促進因子の測定について. 日本細菌学雑誌, 16(3), 1961.
- 10) 林 貽恵：タイワンハブ毒トキシノイドの基礎的研究. Snake, 4, 34-43, 1972.
- 11) 沢井芳男, 川村善治, 福山民夫, 清水敏夫, 小此木 丘, 服部善八郎, 五十嵐 勇：ハブ蛇毒トキシノイドの基礎的研究. 2. マウス足臍法によるトキシノイドの副作用に関する実験的研究. 日本細菌学雑誌, 22, 67-72, 1967.
- 12) Sato, T., et al.: Studies on snake venoms. The journal of biochemistry. 57(3), pp. 1965.
- 13) Winter, C. A. et al.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 111, 544.
- 14) 山川雅延：サキシマハブ毒の出血および致死因子に関する研究. Snake, 4, 96-107, 1972.